论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0416-03

胃癌患者外周血树突状细胞的分离与培养

石 彦,余佩武,张 超,赵永亮,雷 晓,王自强,曾冬竹 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨从胃癌患者外周血分离与扩增树突状细胞(dendritic cells, DCs)的有效方法。**方法** 从胃癌患者外周血分离出贴壁单个核细胞,实验组将其与细胞因子GM-CSF、IL-4和TNF-α共同培养,对照组不加细胞因子,动态观察细胞生长情况,流式细胞仪检测实验组不同培养时相细胞表面分子CD86、CD80、HLA-DR的表达水平,并和对照组比较。**结果** 与对照组比,实验组诱导出大量具有典型形态的DCs,培养至第7天,胃癌患者外周血DCs细胞表型表达较第3天增高非常显著($P<0.01$),与对照组相差显著($P<0.01$);培养第12天,DCs细胞表型表达与第3天比较相差非常显著($P<0.01$),与培养第7天比较相差不显著($P>0.05$),与对照组相差显著($P<0.01$)。**结论** 联合应用GM-CSF、IL-4和TNF-α能有效的从胃癌患者外周培养出大量具有活性的DCs。

关键词: 胃癌;外周血;树突状细胞

中图法分类号: R329.2; R331.1; R735.2 **文献标识码:** A

Separation and amplification of dendritic cells from peripheral blood of patients with gastric cancer

SHI Yan, YU Pei-wu, ZHANG Chao, ZHAO Yong-liang, LEI Xiao, WANG Zi-qiang, ZENG Dong-zhu (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the available method to isolate and amplify dentritic cells from peripheral blood of gastric cancer patients. **Methods** The peripheral blood mononuclear cells were isolated from gastric cancer patients and cultured with GM-CSF, IL-4 and TNF-α in experimental group but without those cytokines in control group. The real-time cell growing condition was observed and the expression level of cell surface molecule (CSM) like CD86, CD80, HLA-DR in experimental group was detected using flow cytometry. **Results** A larger number of dentritic cells of classic morphous were found in experimental group than control group. On day 7, 12 after cell culture, the DCs cell phenotype expression level is much higher than that on day 3 as well as control group ($P<0.01$), but no significant differences were found between on day 12 and 7 ($P>0.05$). **Conclusion** It is an effective way to cultivate large amount of active DCs in peripheral blood from gastric cancer patients by using GM-CSF, IL-4 and TNF-α together.

Key words: gastric cancer; peripheral blood; dendritic cells

树突状细胞(dendritic cells, DCs)被认为是体内功能最强的专职抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC),是T细胞和肿瘤细胞相互作用的桥梁,在诱导高效而特异的抗肿瘤免疫中起关键作用。但DCs在外周血中数量非常少,属于微量细胞群,且DCs分离纯化方法复杂,严重妨碍对DCs的深入研究。本研究以胃癌患者外周血为研究对象,探讨在体外分离、纯化和扩增外周血DCs的方法,以获得大量具有活性的DCs,为其在胃癌生物治疗的实验研究和临床应用提供保障。

1 对象与方法

1.1 研究对象

我院普通外科2003年收治的胃癌患者30例,所有病例均术后病理检查确诊,且均未接受任何抗肿瘤治疗。其中男性17例,女性13例,年龄30~68岁,平均年龄45.6岁。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM培养基(Gibco, USA);重组人粒/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、重组人IL-4、TNF-α(Sigma, USA);淋巴细胞分离液(TDB);鼠抗人CD86、CD80、HLA-DR单克隆抗体(Gibco, USA);流式细胞仪(Beckman, USA)。

1.3 外周血DCs的分离与培养

无菌取胃癌患者外周静脉血40 ml,肝素抗凝,与等量的pH 7.2 Hanks溶液混匀;用淋巴细胞分层液(Ficoll-Hypaque)分离、收集单核细胞于50 ml离心管中,加入5倍以上含5%小牛血清的Hanks液稀释,1 500 r/min,离心10 min,弃上清后,分别以1 500、1 000 r/min离心5 min,PBS洗涤细胞2次,即获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。

用含5%小牛血清的DMEM将PBMC配制成细胞悬液,而后置于玻璃平皿内,37 ℃ 5% CO_2浓度孵箱培养120 min,吸除非吸附细胞,用Hanks液轻轻吹打培养皿,再次吸除非吸附细胞,然后收集贴壁的单个核细胞。

作者简介:石 彦(1973-),男,山东省济南市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事胃肠道肿瘤治疗方面的研究。电话:(023)68754146

通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com

收稿日期:2005-07-11;修回日期:2005-10-19

实验组：取6孔培养板，每孔加1 ml DMEM完全培养基，然后加单个核细胞，初始浓度为2×10^4个/ml，培养2 h后加入细胞因子GM-CSF为50 ng/ml及IL-4 100 ng/ml，培养72 h追加1次，培养6 d后加入TNF-α 50 ng/ml。对照组：取6孔培养板，每孔加1 ml DMEM完全培养基，然后加单个核细胞，初始浓度为2×10^4个/ml，不加任何细胞因子，以后隔天半量换液。

1.4　显微镜下动态观察细胞生长情况

在DCs发育过程中，光镜下连续观察DCs形态学变化。

1.5　DC细胞表型CD86、CD80、HLA-DR的检测

分别于培养后第3、7、12天收获DCs，制备成单细胞悬液，PBS 1 000 r/min，离心10 min，洗涤1次，弃上清，PBS重悬浮后，分别加入4个试管，每管500 μl，分别加入CD86、CD80、HLA-DR及IgG1直标荧光抗体15 μl，4 ℃ 30 min避光染色，流式细胞仪检测。

1.6　统计学分析

所得数据取以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　胃癌患者外周血培养DCs的形态学变化

实验组胃癌患者外周血DCs在培养2 h内贴壁，呈圆形，培养第3天，细胞表面有少量毛刺样突起，细胞形态较规则，细胞膜清晰完整，部分细胞成团聚集生长；培养第7天，DCs悬浮生长，形态规则，表面有大量毛刺样突起，细胞散在（图1）；培养第12天，DCs悬浮生长，体积明显增大，细胞表面毛刺进一步增多，并且清晰，培养第14天细胞开始凋亡。40 ml外周血经GM-CSF、IL-4和TNF-α诱导能分离得到$(3\sim5)\times10^6$个DCs。

对照组细胞则未见上述改变，随着培养时间延长，对照组细胞内逐渐出现颗粒，细胞开始裂解。

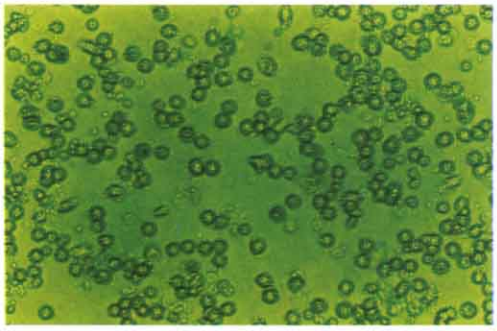


图1　外周血来源的DCs培养第7天　（倒置显微镜×200）

2.2　胃癌患者外周血培养DCs细胞表型检测

实验组外周血DCs培养第3天既有CD86、CD80、HLA-DR表达，但表达水平较低，随着培养时间延长，DCs细胞表型逐渐升高。培养第7天，外周血DCs细胞表型表达较第3天增高非常显著（$P<0.01$）；培养第12天，DCs细胞表型表达与第3天比较相差非常显著（$P<0.01$），与培养第7天比较相差不显著（$P>0.05$）（表1）。

对照组外周血DCs培养第3天也开始有CD86、CD80、HLA-DR表达，表达水平与实验组相差不显著。至培养第7天，胃癌患者外周血DCs细胞表型表达较第3天增高不显著（$P>0.05$），与实验组相差非常显著（$P<0.01$）；培养第12天，DCs细胞表型表达与培养第7天比较相差不显著（$P>0.05$），与实验组相差非常显著（$P<0.01$）（表1）。

表1　胃癌患者外周血DCs不同培养时相细胞表型[$n=30$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	3 d	7 d	12 d
实验组			
CD80	12.1±1.3	65.4±6.7[ab]	67.1±7.6[ab]
CD86	13.2±1.4	60.8±8.2[ab]	62.2±7.0[ab]
HLA-DR	13.5±1.1	56.3±11.5[ab]	57.9±12.1[ab]
对照组			
CD80	11.8±1.7	12.3±1.6	10.9±1.5
CD86	13.6±2.0	14.2±1.8	12.2±1.8
HLA-DR	12.9±1.6	12.1±1.7	11.4±1.6

a：$P<0.01$，与培养3 d后比较；b：$P<0.01$，与对照组比较

3　讨论

在我国，胃癌的发病率和病死率均居全身恶性肿瘤首位，尽管手术联合化疗对早期胃癌疗效满意，但进展期胃癌的5年生存率仍然很低。目前肿瘤生物治疗已成为继手术、化疗和放疗后的第4种肿瘤治疗方案，给人们克服恶性肿瘤的威胁带来新的希望。树突状细胞作为机体内专职的APC，在提呈抗原及激发后续特异性抗肿瘤免疫反应中发挥着不可替代的重要作用[1]，是近年来肿瘤生物治疗的研究热点。但外周血DCs数量甚微（约占PBMC的0.1%～1%），给实验研究和临床应用带来很大困难。因此，探索一种在体外快速分离、纯化及扩增DCs的方法十分必要。

GM-CSF是维持DCs分化及发育的最基本细胞因子，能诱导产生少量DCs集落，IL-4能抑制细胞培养过程中粒细胞和巨噬细胞的产生，并维持DCs于未成熟状态，TNF-α则能抑制粒细胞的产生，同时具有促进DCs成熟的作用，只有成熟的DCs才能有效呈递抗原，以激发特异性T细胞的抗肿瘤应答[2]。因此，联合应用GM-CSF、IL-4和TNF-α可产生相辅相成的作用，能有效的扩增出大量具有生物活性的DCs。本实验中，胃癌患者外周血PBMC经GM-CSF、IL-4和TNF-α联合培养7 d后，诱导产生的细胞可观察到典型的DCs细胞特征，并且成熟DCs细胞表型CD86、CD80、HLA-DR的表达水平高，而对照组则没有诱导出具有典型细胞形态和表面分子的DCs，说明经实验组细胞因子联合诱导产生的细胞是DCs。

肿瘤患者体内DCs数量少、活性低，可能与肿瘤细胞产生的细胞因子对DCs的抑制有关，如血管内皮生长因子（VEGF）能抑制DCs前体向成熟DCs发育，IL-10能抑制DCs表面CD86和HLA-DR分子的表达等。而DCs表面各种免疫分子的正常表达是DCs发挥其独特的抗原递呈和免疫调节功能，诱导高效而特异的抗肿瘤免疫反应的基础[3]。DCs表面分子CD86、

CD80和HLA-DR的表达水平，直接关系到DCs免疫激发的功能状态。特别是CD86和CD80，作为DCs激活T淋巴细胞过程中的重要共刺激分子，尤为重要，直接关系到DCs免疫激活能力的高低[4]。在该实验中，我们对胃癌患者外周血分离扩增的DCs表面分子进行了检测，发现随着DCs的成熟，其表面分子CD86、CD80和HLA-DR的表达量逐渐升高，至培养12 d DCs成熟时表达趋于稳定，而对照组细胞表面分子没有明显变化，说明该实验方法获得的DCs具有较强的生物活性。

本实验说明，应用GM-CSF、IL-4和TNF-α，能直接从胃癌患者外周血PBMC中培养出大量较高纯度并具有较高活性的DCs，为对胃癌患者外周血DCs进行深入研究奠定了基础，为临床上通过增强胃癌患者DCs免疫状态，对胃癌患者进行有效的生物治疗提供了可能。

参考文献：

[1] DALERBA P, MACCALLI C, CASATI C, *et al*. Immunology and immunotherapy of colorectal cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2003, 46(1): 33-57.

[2] REMMEL E, TERRACCIANO L, NOPPEN C, *et al*. Modulation of dendritic cell phenotype and mobility by tumor cells in vitro[J]. Hum Immunol, 2001, 62(1): 39-49.

[3] MEIDENBAUER N, ANDREESEN R, MACKENSEN A. Dendritic cells for specific cancer immunotherapy[J]. Biol Chem, 2001, 382(4): 507-520.

[4] HOWARD C J, HOPE J C, STEPHENS S A, *et al*. Co-stimulation and modulation of the ensuing immune response[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2002, 87(3-4): 123-130.

[5] 汪 灏，余佩武，郝 群，等. 临床用的抗肿瘤树突状细胞疫苗的制备及保存[J]. 第三军医大学学报，2004，26(14)：1314-1316.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)05-0418-01

超声诊断原发性输卵管癌1例

高顺记，钟 红 （广州军区武汉总医院特诊科，武汉 430070）

患者，女性，61岁，已婚，因“绝经10年，阴道不规则流液9个月”，于2003年8月7日入院。患者自1993年绝经后一般情况良好，于2002年11月阴道出现不规则流液，色淡红，先后在当地医院行B超、宫腔镜检查均未见异常，2003年7月行“诊刮术”，病理见“少许萎陷增生内膜腺体及间质”，术后予止血、消炎等综合治疗效果不佳，为进一步检查治疗入我院妇产科，入院查体未见异常。经腹超声检查见子宫形态大小正常，轮廓清晰光滑，宫内肌层回声均匀，宫腔可见宽约0.5 cm液性暗区。左侧附件区可见一大小约7.0 cm×2.5 cm腊肠型实性肿块，肿块自左侧宫角向外延续至伞端，边界清晰，内部回声不均，近宫角处可见小管状结构。彩色多普勒示：肿块周边较丰富血流信号。测得其内一支动脉血流最大流速为17 cm/s，阻力指数0.57。右侧附件区及腹腔未见异常回声。超声提示：①左侧附件区实性占位，考虑输卵管癌可能；②宫腔少量积液。入院第5天在持续硬膜外麻醉下行输卵管癌根治术。术中见子宫稍萎缩，形态无异常，左侧输卵管明显增粗迂曲，呈实性，伞端闭合。先行左侧输卵管切除术，快速病理切片示“（左）输卵管癌”，遂行全子宫切除+双侧附件扩大切除+大网膜切除+阑尾切除术。术后常规切片左输卵管肿物镜下见大量癌细胞呈乳头状、腺管样成片排列，核大异形明显，管壁可见癌细胞浸润；其余送检组织未见癌细胞浸润。病理诊断：（左）输卵管乳头状腺癌。

讨论

原发性输卵管癌是临床罕见的女性生殖系统恶性肿瘤，其发病率约占妇科恶性肿瘤的0.2%～0.5%[1]。发病年龄平均52岁，2/3患者发生于绝经后。李洪君等[2]统计协和医科大学附属肿瘤医院1958-1997年经该院病理证实的原发输卵管癌共54例，占同期该院妇科恶性肿瘤数的0.32%。该病病因不明，目前多认为慢性炎性刺激可能是发病诱因。单侧发病居多，好发于盆腹部，病程逐渐进展后，输卵管增粗呈腊肠样，病理检查多数为腺癌。主要临床症状为阴道排液、腹痛、盆腔包块及腹腔积液，因缺乏特异性，故易被忽视或误诊。B超检查由于无创、经济、重复性好等优点，在该病的诊断及鉴别诊断中有一定的帮助。对于绝经后阴道不规则流液的患者，B超检查子宫未见异常，不应忽视对双侧附件区的探查，若于宫旁探及小肿块或可疑肿块，应引起重视。彩色多普勒显示肿块内血流阻力指数低者，无应高度警惕。治疗上强调首次治疗的彻底性，以手术治疗为主，术后辅以放、化疗。本病5年存活率为20%～30%，早期诊治及输卵管伞端闭锁者预后较好。

关键词：超声诊断；输卵管癌

中图法分类号：R730.41；R737.32 文献标识码：B

参考文献

[1] 顾美皎. 临床妇产科学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001：972-976.

[2] 李洪君，章文华，吴令英，等. 原发性输卵管癌54例临床分析[J]. 实用肿瘤杂志，2001，16(3)：185-187.

[3] 谢宇珍，宋成文，夏 力. 经腹彩色多普勒显像对诊断卵巢恶性肿瘤的评价[J]. 华南国防医学杂志，2000，14(2)：4-6.

（编辑 薛国文）

作者简介：高顺记(1978-)，男，福建省泉州市人，医师，主要从事腹部及乳表器官疾病超声诊断方面的研究。电话：(027)68878747

收稿日期：2005-01-21；修回日期：2005-04-28